

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Nela Kohoutová

## VOLTAMETRICKÉ CHOVÁNÍ A STANOVENÍ KYSELINY INDOLMÁSELNÉ A INDOLOCTOVÉ

Voltammetric behaviour and determination of indole-3-butyric and indole-3-acetic acid

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Jiří Zima, CSc.

Konzultant bakalářské práce: RNDr. Hana Dejmková, Ph.D.

Praha 2018

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne .....

.....  
Nela Kohoutová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu práce, prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc., a také RNDr. Haně Dejmkové, Ph.D., za jejich odbornou pomoc a cenné rady. Dále děkuji své rodině a přátelům za podporu, jak během sepisování této práce, tak během celého studia.

## Abstrakt

V této práci bylo studováno voltametrické chování a stanovení kyselin indolmásečné a indolactové s cílem pokusit se s využitím dekonvoluce stanovit obě látky vedle sebe. Jako první byla provedena měření s uhlíkovou pastovou elektrodou (CPE) v prostředí Brittonova-Robinsonova (BR) pufru o pH 2, 4, 6, 8, 10 a 12, během kterých však bylo zjištěno, že CPE není pro stanovení těchto látek vhodná, kvůli vzniku vedlejších píků, které pravděpodobně způsobovaly oxidační produkty studovaných kyselin. Pastová elektroda proto byla pro další měření nahrazena elektrodou ze skelného uhlíku.

Vzhledem k záměru stanovit studované látky společně, byl nakonec jako nejvhodnější elektrolyt zvolen 0,05M roztok kyseliny sírové o pH 1,2, jelikož v prostředí tohoto roztoku bylo dosaženo většího rozdílu mezi potenciály píků obou látek než při pH 2 v BR pufru.

Proměřením kalibračních roztoků v rozmezí koncentrací  $10 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  byla potvrzena linearita proudové odezvy v závislosti na koncentraci studovaných látek. Zjištěné meze detekce pro obě látky byly v mikromolárních koncentracích.

S využitím dekonvoluce se skutečně podařilo stanovit obě látky vedle sebe, avšak dosažené výsledky byly značně nepřesné, a to jak v připravených roztocích, tak v reálném vzorku.

## Abstract

This work has been based on a study of voltametric behaviour and determination of indole-3-butyric and indole-3-acetic acid with aim to use deconvolution for determination of both substances simultaneously. First measurements were made using a carbon paste electrode in Britton-Robinson buffer in the pH of 2, 4, 6, 8, 10 and 12. However, CPE is not suitable for determination of such substances because of generation of side peaks, which were possibly the result of oxidation of products of these studied substances. The carbon paste electrode was therefore replaced by a glassy carbon electrode.

Considering the aim to determine both substances simultaneously, the most effective electrolyte appeared to be a 0,05M solution of sulphuric acid (pH=1,2), because there was higher peak difference of both substances in this solution than in the BR buffer (pH=2).

The linearity of current response on the concentration of studied substances was confirmed by measuring a series of calibration solutions ( $10 - 100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Found limits of detection were in micromolar levels for both substances.

With the use of deconvolution, both substances could indeed be simultaneously determined. However, achieved results were highly inaccurate, not only in prepared solutions, but also in real sample.

## **Klíčová slova**

diferenční pulsní voltametrie

uhlíková pastová elektroda

elektroda ze skelného uhlíku

kyselina indolmásečná

kyselina indolactová

dekonvoluce

## **Key words**

differential pulse voltammetry

carbon paste electrode

glassy carbone electrode

indole-3-butyric acid

indole-3-acetic acid

deconvolution

# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>10</b>
1.1 Cíl práce .....	10
1.2 Studované látky.....	10
1.2.1 Kyselina indolactová .....	10
1.2.2 Kyselina indolmásečná.....	11
1.2.3 Metody stanovení IAA a IBA.....	12
1.3 Dekonvoluce .....	13
<b>2. Experimentální část.....</b>	<b>14</b>
2.1 Použitá aparatura.....	14
2.1.1 Voltametrie .....	14
2.1.2 Další přístroje .....	14
2.2 Příprava pastové elektrody.....	14
2.3 Příprava použitých chemikálií .....	14
2.3.1 Příprava zásobních roztoků studovaných látek .....	14
2.3.2 Příprava elektrolytů .....	15
2.4 Voltametrické měření .....	15
2.5 Zpracování dat .....	15
<b>3. Výsledky a diskuze .....</b>	<b>16</b>
3.1 Měření na CPE.....	16
3.2 Optimalizace podmínek měření na GCE .....	18
3.2.1 Vliv pH elektrolytu.....	18
3.2.2 Pasivace elektrody .....	22
3.3 Kalibrační křivky .....	24
3.4 Voltametrické stanovení IAA a IBA vedle sebe s využitím dekonvoluce .....	27
3.5 Voltametrické stanovení IAA a IBA v přípravku Stimulax .....	30
<b>4. Závěr.....</b>	<b>32</b>
<b>5. Literatura.....</b>	<b>33</b>

## Seznam použitých zkratk

BChE	butyrylcholinesterasa
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
$c$	molární koncentrace [M; mol·dm <sup>-3</sup> ]
CAS	Chemical Abstracts Service
CE	kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
CL	chemiluminiscence
CPE	uhlíková pastová elektroda (Carbon Paste Electrode)
DLLME	kapalinová mikroextrakce (Dispersive Liquid–Liquid Microextraction)
DHP	Dihexadecyl Hydrogen Phosphate
DPV	diferenční pulsní voltametrie (Differential Pulse Voltammetry)
$E$	potenciál [mV]
$E_p$	potenciál píku [mV]
ED	elektrochemická detekce (Electrochemical Detection)
GCE	elektroda ze skelného uhlíku (Glassy Carbon Electrode)
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (Gas Chromatography Mass Spektrometry)
GPU	kombinovaná grafit-polyuretanová elektroda (Graphite–PolyUrethane)
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda (Hanging Mercury Drop Electrode)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
$I$	proud [nA]
$I_p$	výška píku [nA]
IAA	kyselina indolactová
IBA	kyselina indolmásečná
$L_{1,2}$	interval spolehlivosti
LOD	mez detekce (Limit Of Detection)



<i>LOQ</i>	mez stanovitelnosti (Limit Of Quantification)
MAD	derivatizace v mikrovlnném poli (Microwave Assisted Derivatization)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
p.a.	pro analýzu
PDT	fotodynamická terapie (PhotoDynamic Therapy)
PG	tužková grafitová elektroda (Pencil-lead Graphite)
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
$pK_a$	kyselá disociační konstanta
<i>R</i>	korelační koeficient
<i>RSD</i>	relativní směrodatná odchylka
UV-Vis	spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra (UltraViolet-Visible)

# 1. Úvod

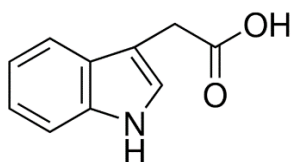
## 1.1 Cíl práce

Cílem této práce je prostudování voltametrického chování kyselin indolmásečné a indolactové, nalezení vhodných podmínek pro jejich stanovení metodou diferenční pulsní voltametrie s použitím uhlíkové pastové elektrody a elektrody ze skelného uhlíku a následně také pokus o jejich stanovení vedle sebe s využitím matematické dekonvoluce, a to jak v připravených roztocích, tak v reálném vzorku.

## 1.2 Studované látky

Kyseliny indolactová (IAA) a indolmásečná (IBA) jsou dva významné rostlinné hormony (fytohormony), tedy organické látky produkované rostlinami ve velmi nízkých koncentracích, regulující jejich růst a rozvoj [1, 2]. Patří do skupiny auxinů, jež jsou považovány za regulátory dělení, prodlužování a diferenciace buněk [3].

### 1.2.1 Kyselina indolactová



**Obr. 2.1** Strukturní vzorec indolactové kyseliny

CAS číslo: 87-51-4

Sumární vzorec:  $C_{10}H_9NO_2$

Bod tání: 168-170 °C [4]

Molární hmotnost: 175,18 g/mol

Kyselá disociační konstanta: 4,75 [5]

Další používané názvy: indolyl-3-octová kyselina, indol-3-octová kyselina, heteroauxin, Rhizopin, Rhizopon A

Kyselina indolactová (obr. 2.1) krystalická látka světle lososové barvy. Ve vodě je omezeně rozpustná (1,5 g/l při 20 °C), dobře se rozpouští v ethanolu (50 g/l) a dalších

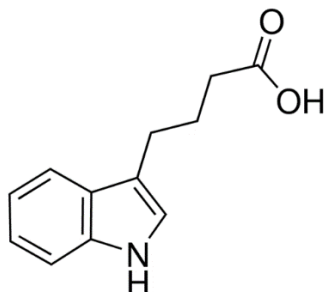
organických rozpouštědlech jako aceton, diethylether nebo chloroform. Je citlivá na světlo, proto je třeba ji uchovávat v chladu a temnu [5, 6, 7].

U rostlin je syntetizována v mladých listech, stoncích a semenech transaminační a dekarboxylační reakcí tryptofanu [8] nebo také  $\beta$ -oxidací IBA [9]. Je nezbytná pro růst a účastní se téměř každého vývojového procesu v životním cyklu rostlin [10]. Přestože se jedná o nejznámější a nejvíce studovaný auxin, poprvé byla izolována v roce 1934 z lidské moči [11].

Kyselina indolactová napomáhá zakořeňování řízků rostlin a podporuje kvetení a růst. Je obsažena v mnoha komerčně dostupných přípravcích. V roce 2016 pro ni byl Evropskou unií, jakožto pro pesticid, stanoven limit obsahu v potravinách. Koncentrace by neměla být vyšší než 0,1 mg/kg [12]. Vzhledem k jejímu častému užívání v zemědělství se dostává i k necílovým organismům, byl studován její vliv na inhibici butyrylcholinesterasy (BChE) v lidském a koňském séru [13].

Vědci se zabývají také možností jejího využití v medicíně. Byl prokázán pozitivní efekt fotodynamické terapie kyselinou indolactovou (IAA PDT) při léčbě akné [14].

### 1.2.2 Kyselina indolmásečná



**Obr. 2.2** Strukturní vzorec indolmásečné kyseliny

CAS číslo: 133-32-4

Sumární vzorec:  $C_{12}H_{13}NO_2$

Molární hmotnost: 203,24 g/mol

Bod tání: 123-125 °C [4]

Další používané názvy: indolyl-3-másečná kyselina, indol-3-másečná kyselina, Seradix, Hormodin

Kyselina indolmásečná (obr. 2.2) je prášek béžové barvy [15], ve vodě je téměř nerozpustná (250 mg/l při 20 °C) [4], dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech.

Stejně jako kyselina indolactová je i kyselina indolmásečná přirozeně syntetizována v rostlinách. Jejich produkce je velmi úzce spojena, IBA z IAA vzniká a současně se na ni může zpětně přeměňovat [16]. Jakožto auxin má IBA nižší aktivitu než IAA, je však stabilnější a méně citlivá k degradujícím enzymům [17]. Je považována za skladovou formu IAA [18]. Pro tyto vlastnosti je IBA nejběžněji používaným regulátorem pro růst rostlin [17].

Z nařízení Evropské unie z roku 2016, platí pro IBA stejné limity obsahu v potravinách jako pro IAA, tedy 0,1 mg/kg [12]. Studie se zabývají jejím použitím v kombinaci s dalšími auxiny, vhodnou koncentrací a dobou aplikace [19, 20, 21].

### 1.2.3 Metody stanovení IAA a IBA

Studované látky jsou často stanovovány společně s dalšími fytohormony [22, 23]. Obvyklou metodou stanovení je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s různými způsoby detekce – tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) [24], chemiluminiscence (CL) [25], spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV-Vis) [26]. Dále je používána také kapilární elektroforéza (CE) s amperometrickou a UV detekcí [10] nebo plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS) [27]. Citlivost některých metod je uvedena v tab. 2.1.

**Tab. 2.1** Srovnání meze detekce při stanovení IAA a IBA vybranými metodami

metoda stanovení	<i>LOD</i> [mol·dm <sup>-3</sup> ]	<i>LOD</i> [mol·dm <sup>-3</sup> ]	zdroj
	IAA	IBA	
HPLC-MS/MS	$1,7 \cdot 10^{-9}$	$9,8 \cdot 10^{-11}$	[24]
HPLC-CL	$1,1 \cdot 10^{-7}$	$9,8 \cdot 10^{-7}$	[25]
HPLC/UV-Vis	$9,1 \cdot 10^{-7}$	$4,5 \cdot 10^{-7}$	[26]
CE s amperometrickou detekcí	$1,3 \cdot 10^{-8}$	$1,4 \cdot 10^{-8}$	[10]
GC/MS po DLLME a MAD	$2,9 \cdot 10^{-10}$	$2,5 \cdot 10^{-10}$	[27]

Z elektrochemických metod jsou využívána stanovení amperometrická a voltametrická. Kyselina indolactová byla amperometricky stanovena s použitím zlaté elektrody s  $\text{CeCl}_3$ -DHP filmem [8] a GCE s filmem uhlíkových nanočástic [1], voltametricky potom s kombinovanou grafit-polyuretanovou elektrodou [2], PG elektrodou [28] nebo borem dopovanou diamantovou elektrodou [29]. Kyselina indolmásečná byla stanovena voltametricky s využitím rtuťové elektrody (HMDE) [30]. Citlivost těchto stanovení je uvedena v tab. 2.2.

**Tab. 2.2** Srovnání meze detekce při stanovení IAA a IBA vybranými elektrochemickými metodami

analyt	metoda	elektroda	<i>LOD</i>	zdroj
			[ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	
IAA	amperometrie	zlatá s $\text{CeCl}_3$ -DHP filmem	$3,0 \cdot 10^{-8}$	[8]
IAA	amperometrie	GC s filmem uhlíkových nanočástic	$2,0 \cdot 10^{-8}$	[1]
IAA	voltametrie	GPU	$1,5 \cdot 10^{-7}$	[2]
IAA	voltametrie	PG	$1,4 \cdot 10^{-7}$	[28]
IAA	voltametrie	borem dopovaná diamantová	$1,2 \cdot 10^{-6}$	[29]
IBA	voltametrie	HMDE	$2,0 \cdot 10^{-7}$	[30]

### 1.3 Dekonvoluce

Obecně existuje několik způsobů, jak vyřešit problém blízkých nebo překrývajících se elektrochemických signálů. Jednou z možností je přístup chemický, tedy kupříkladu volba vhodného elektrolytu nebo přidání komplexotvorného činidla, což má za následek oddálení píků stanovovaných látek. Další možností je potom přístup matematický – dekonvoluce [31].

V případě dekonvoluce jsou známy polohy píků, každé ze stanovovaných látek. Matematickou analýzou jsou následně navrženy píky pro každý analyt tak, aby jejich výsledný součet odpovídal píku naměřenému. Po jejím provedení je již možné, za pomoci jednoduché kalibrace, dopočítat příspěvek jednotlivých analytů z výšek nebo ploch jejich dekonvolucí zjištěných píků [32].

## 2. Experimentální část

### 2.1 Použitá aparatura

#### 2.1.1 Voltametrie

Voltametrická měření byla provedena na sestavě Eco-Tribo-Polarograph (PolaroSensors, ČR), s tříelektrodovým zapojením, ovládané softwarem PolarPro 5.1. Postupně byly využity dva druhy pracovních elektrod – uhlíková pastová elektroda (CPE) v teflonovém těle s nerezovým pístem pro vytlačení pasty a kruhovou aktivní plochou o průměru 2 mm a dále potom elektroda ze skelného uhlíku (GCE) o průměru 3 mm. Jako referentní byla použita argentchloridová elektroda v roztoku chloridu draselného o koncentraci  $3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a jako pomocná platinová plíšková elektroda.

#### 2.1.2 Další přístroje

- pH meter 3510 (Jenway, UK) s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway, UK)
- Magnetic Stirrer MS 3000 (Jenway, UK)
- ultrazvuková čistička PSO2000A (Powersonic, USA)

### 2.2 Příprava pastové elektrody

Uhlíková pasta byla připravena odvážením 250 mg grafitu (Graphite Týn, ČR) na analytických vahách, který byl následně v třecí misce homogenizován se 100  $\mu\text{l}$  minerálního oleje (Fluka Biochemika, Švýcarsko). Takto vzniklá směs byla následně napěchována do pouzdra elektrody.

### 2.3 Příprava použitých chemikálií

#### 2.3.1 Příprava zásobních roztoků studovaných látek

Zásobní roztoky byly připraveny navážením přesného množství kyselin indolmásečné (Sigma-Aldrich, USA) a indolactové (98%, Sigma-Aldrich, USA) na analytických vahách, tak aby výsledná koncentrace byla  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Tyto navážky byly převedeny do 100ml odměrných baněk a rozpuštěny v 99 ml deionizované vody

a 1 ml methanolu (p.a., Merck, Německo). Úplného rozpuštění látek bylo dosaženo použitím ultrazvukové čističky.

Vzhledem k citlivosti kyseliny indolactové na světlo a nestálosti jejího zásobního roztoku byly před každým měřicím dnem připravovány zásobní roztoky nové.

### 2.3.2 Příprava elektrolytů

Kyselá složka Brittonova-Robinsonova (BR) pufru byla připravena smísením kyseliny borité (p.a., Lachema Brno, ČR), kyseliny octové (99%, p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR), kyseliny fosforečné (85%, p.a., Lachema, Brno, ČR) a deionizované vody tak, aby koncentrace všech uvedených kyselin byla  $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Požadovaných pH BR pufru bylo dosaženo přidáváním zásadité složky, tedy hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR) o koncentraci  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , za použití pH metru a magnetické míchačky.

Roztok kyseliny sírové (96%, p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR) o koncentraci  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  byl připraven odpipetováním požadovaného množství kyseliny do odměrné baňky s deionizovanou vodou.

## 2.4 Voltametrické měření

Měření byla prováděna metodou diferenční pulsní voltametrie (DPV) s výškou pulsu 50 mV, šířkou pulsu 80 ms a rychlostí polarizace  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . GCE byla po každém měření leštěna na alumině po dobu alespoň 30 s, opláchnuta deionizovanou vodou a osušena (pokud není uvedeno jinak). Všechna měření byla provedena minimálně třikrát.

## 2.5 Zpracování dat

Mez detekce (*LOD*) byla spočítána jako trojnásobek směrodatné odchylky (statisticky vypočítané z výšek píků deseti po sobě jdoucích měření nejnížší měřené koncentrace) podělený směrnici přímky, mez stanovitelnosti (*LOQ*) jako desetinásobek směrodatné odchylky podělený směrnici přímky.

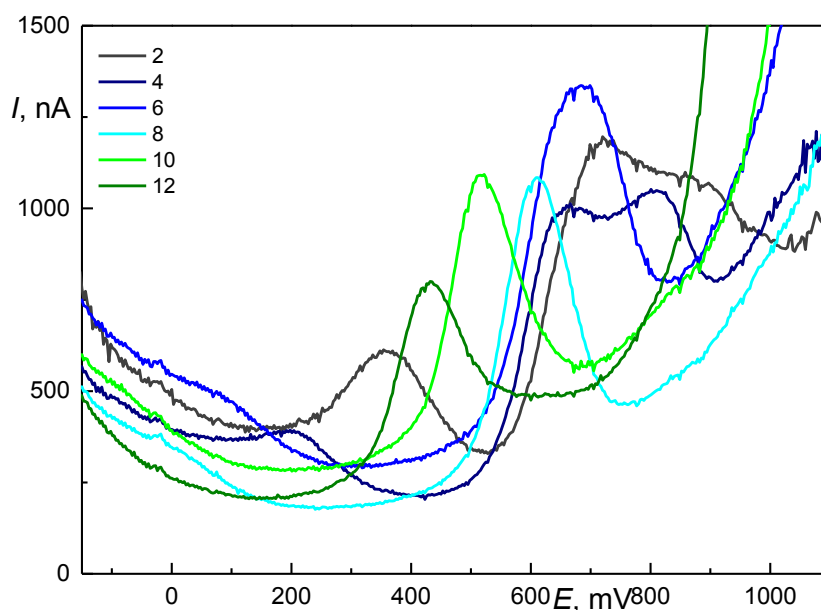
Matematická dekonvoluce byla provedena pomocí Gaussovy aproximace v programu Origin 2016.

### 3. Výsledky a diskuze

#### 3.1 Měření na CPE

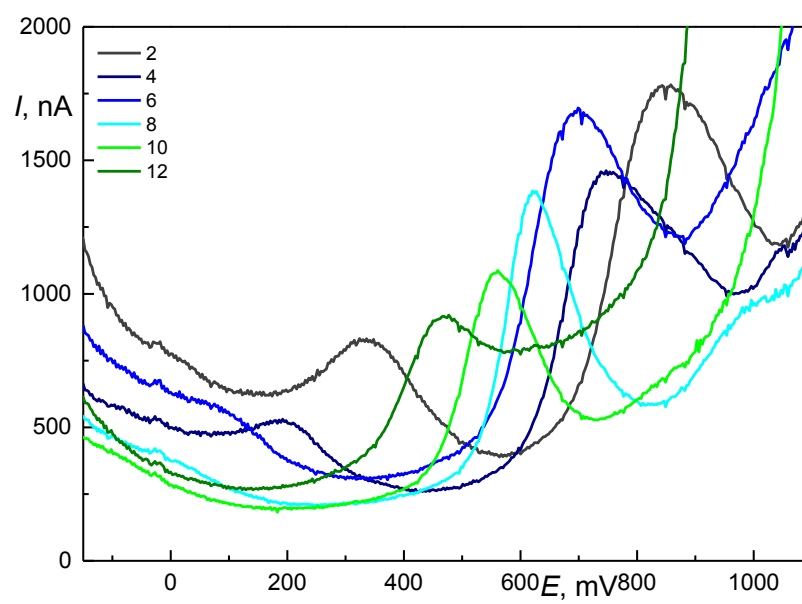
Při voltametrických měřeních má pH elektrolytu zásadní vliv na potenciál i výšku píků studovaných látek. Vliv pH na voltametrické vlastnosti IAA a IBA byl sledován v prostředí BR pufru o pH 2, 4, 6, 8, 10 a 12. Pro měření byl vždy použit roztok jedné z látek o koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  v BR pufru zvoleného pH.

Jak je možné vidět na naměřených voltamogramech (obr. 4.1 a obr. 4.2), před píky IAA a IBA se při všech zvolených hodnotách pH objevovaly menší píky zaznamenávající pravděpodobně jejich oxidační produkty. Tvoření těchto píků se nepodařilo předejít ani obnovováním povrchu elektrody po každém měření. Otřením většího množství pasty bylo docíleno občasného zmenšení těchto vedlejších píků, avšak nikdy se je při opakovaných měřeních nepodařilo odstranit zcela. Pro další měření proto byla CPE nahrazena elektrodou ze skelného uhlíku se kterou se již tento problém neobjevoval.



**Obr. 4.1** Voltamogramy kyseliny indoloctové o koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , naměřené na CPE metodou DPV v prostředí BR pufru o pH 2 až 12.





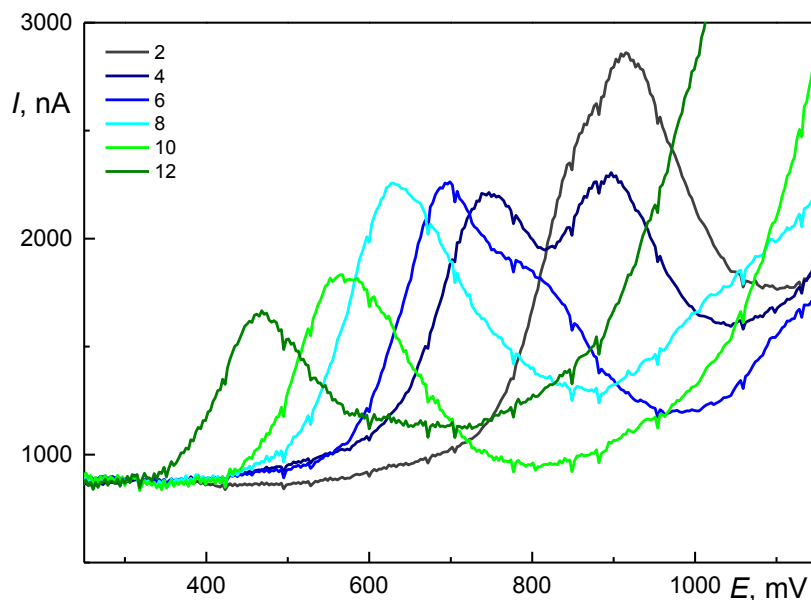
**Obr. 4.2** Voltamogramy kyseliny indolmásečné o koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , naměřené na CPE metodou DPV v prostředí BR pufru o pH 2 až 12.

## 3.2 Optimalizace podmínek měření na GCE

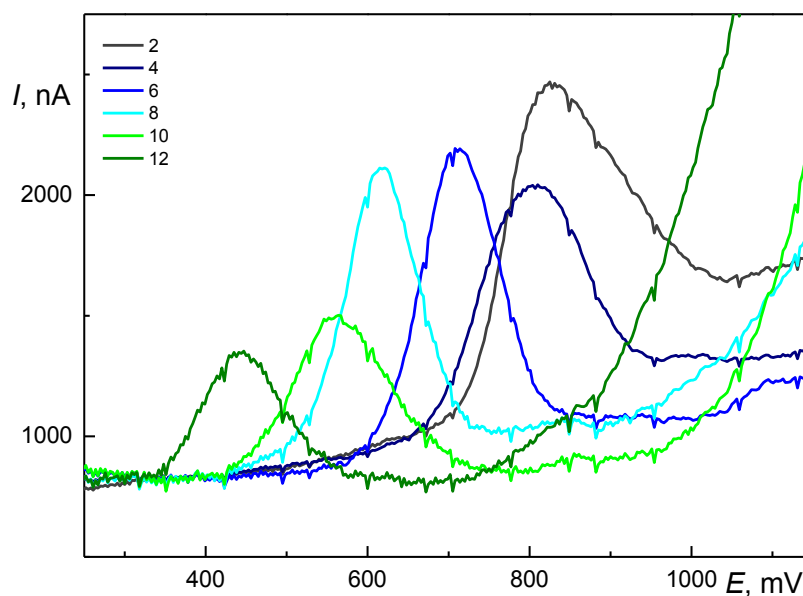
### 3.2.1 Vliv pH elektrolytu

Po změně elektrody byly znovu proměřeny roztoky IAA a IBA o koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  v prostředí BR pufru o pH 2, 4, 6, 8, 10 a 12.

Z naměřených voltamogramů IAA (obr. 4.3) je zjevné, že při pH 4 se objevují dva píky. Náznak druhého píku je viditelný také při pH 2 a 6, tento jev je pravděpodobně způsoben změnou reakčního mechanismu okolo  $pK_a$  jehož hodnota je podle literatury 4,75. Oproti tomu IBA poskytuje jeden pík při všech sledovaných hodnotách pH (obr. 4.4).



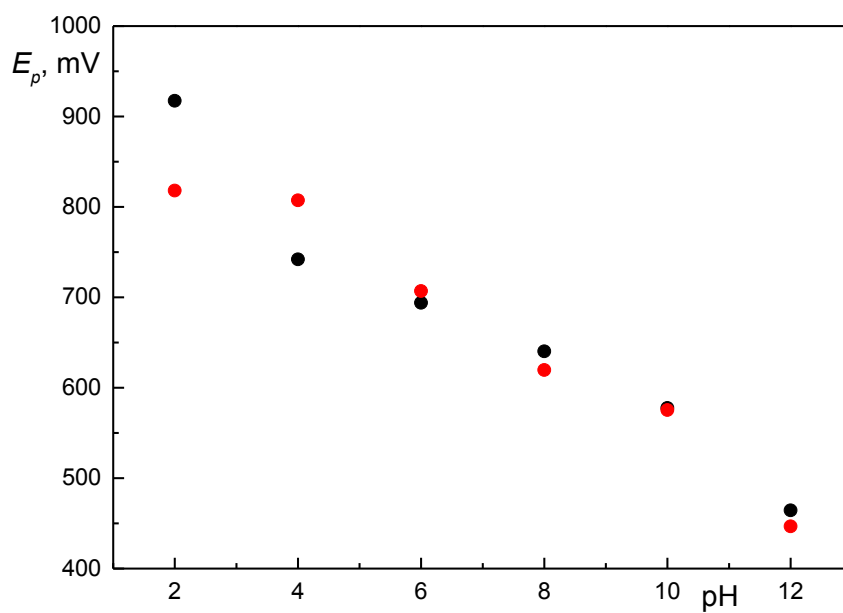
**Obr. 4.3** Voltamogramy kyseliny indolactové o koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , naměřené na GCE metodou DPV v prostředí BR pufru o pH 2 až 12.



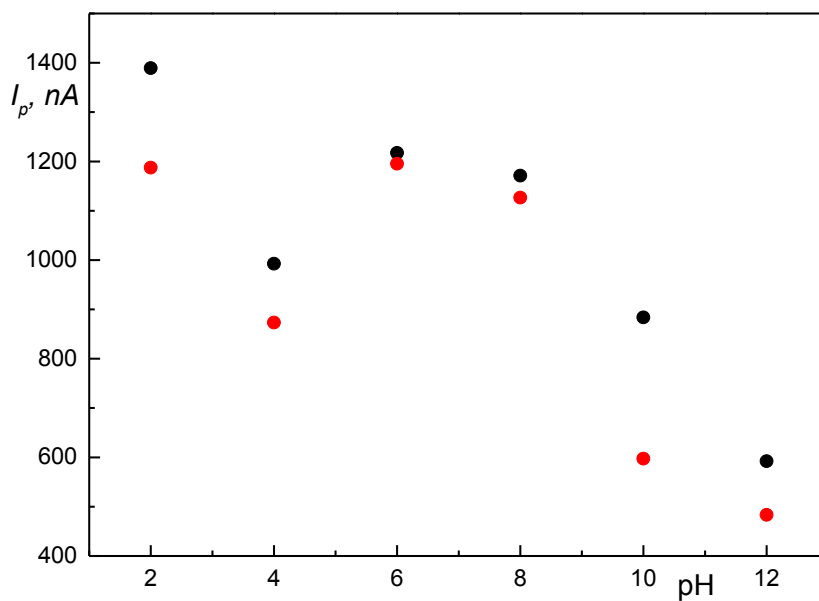
**Obr. 4.4** Voltamogramy kyseliny indolmásečné o koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , naměřené na GCE metodou DPV v prostředí BR pufru o pH 2 až 12.

Potenciál píků obou látek se lineárně snižuje se zvyšující se hodnotou pH, tento trend je možné vidět na obr. 4.3. Pro IAA při pH 4 byl vyhodnocen pouze první pík.

Vzhledem k záměru stanovovat IAA a IBA vedle sebe bylo pro další měření třeba zvolit takové pH základního elektrolytu, při kterém obě látky poskytují co možná nejvyšší proudovou odezvu, mají dobře definovaný tvar píku a současně je co největší rozdíl mezi potenciály jejich píků. Z obr. 4.3 a obr. 4.4. je zjevné, že tomuto požadavku nejlépe odpovídá pH 2.

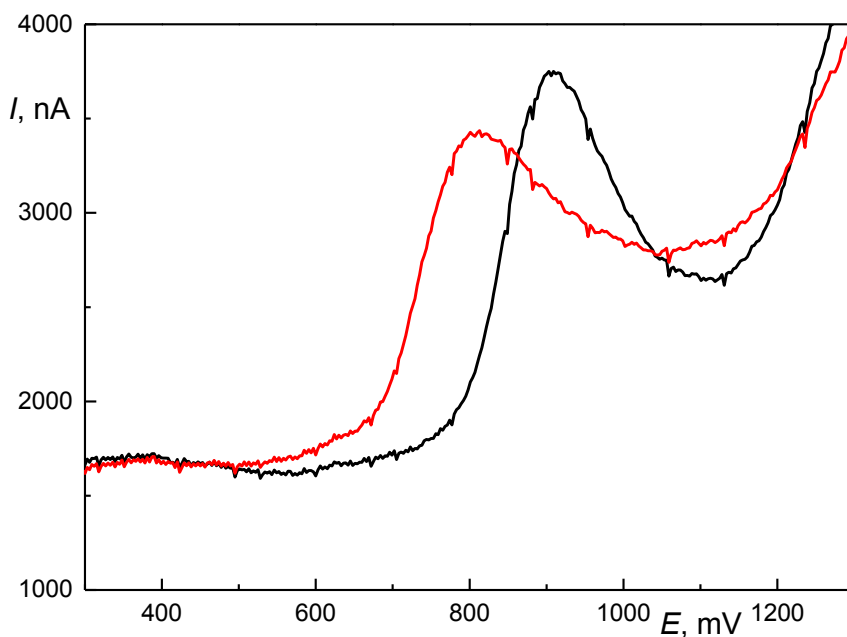


**Obr. 4.3** Závislost potenciálu píků IAA (●) a IBA (●) na pH BR pufru. Koncentrace  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , měřeno na GCE metodou DPV.



**Obr. 4.4** Závislost výšky píků IAA (●) a IBA (●) na pH BR pufru. Koncentrace  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , měřeno na GCE metodou DPV.

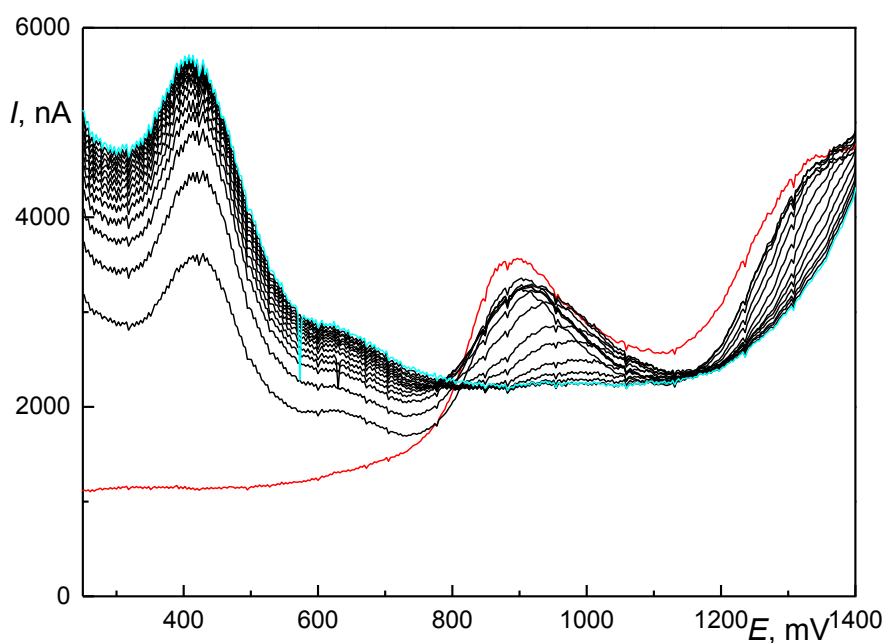
Pro ověření předpokladu, že další snížení pH rozdíl potenciálů píků dále zvětší, byly změřeny voltamogramy studovaných látek v 0,05M roztoku  $\text{H}_2\text{SO}_4$  s hodnotou pH 1,2 (obr. 4.5). Tento předpoklad byl potvrzen – snížením pH se zvětšil rozdíl mezi potenciály a současně se zvětšily i výšky píků. Pro další měření byl tedy jako základní elektrolyt zvolen 0,05M roztok  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .



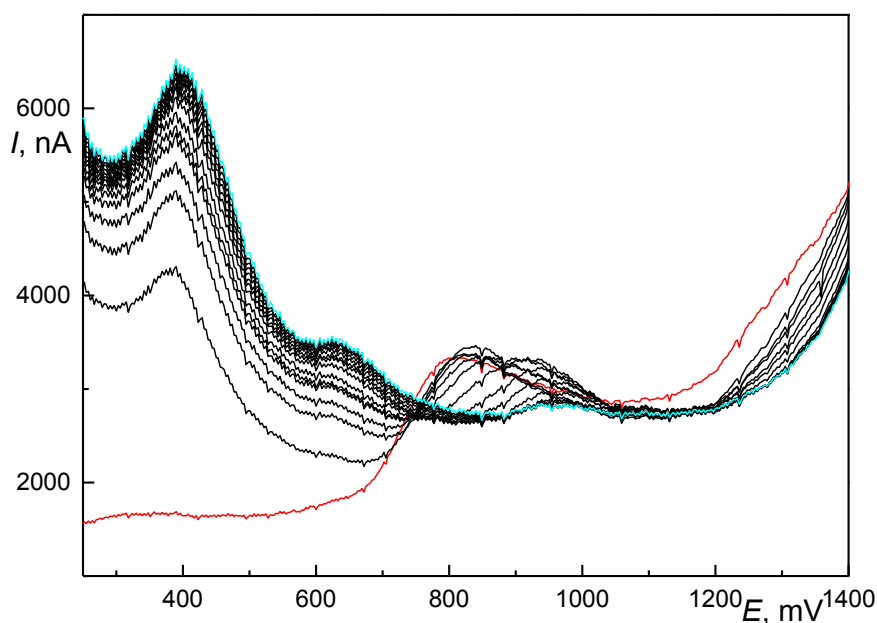
**Obr. 4.5** Srovnání voltamogramů  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  IAA (—) v prostředí 0,05M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o pH 1,2 a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  IBA (—) v prostředí 0,05M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o pH 1,2. Měřeno na GCE metodou DPV.

### 3.2.2 Pasivace elektrody

Pro zjištění míry pasivace GCE bylo provedeno patnáct po sobě jdoucích měření, mezi kterými nebyla elektroda leštěna. Ukázalo se, že k pasivaci dochází, a to tak silně, že je třeba elektrodu leštit po každém měření. Pík kyseliny indolactové vymizel během patnácti měření zcela (obr. 4.6), pík kyseliny indolmásečné téměř (obr. 4.7), u obou látek se objevily píky v oblasti okolo 400 mV, zřejmě související s reakcemi oxidačních produktů studovaných látek.



**Obr. 4.6** Voltamogramy roztoku IAA s koncentrací  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  v prostředí  $0,05\text{M}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  o pH 1,2. Měřeno metodou DPV na GCE bez leštění jejího povrchu mezi jednotlivými měřeními. První měření (—), patnácté měření (—).



**Obr. 4.7** Voltamogramy roztoku IBA s koncentrací  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  v prostředí  $0,05\text{M}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  o pH 1,2. Měřeno metodou DPV na GCE bez leštění jejího povrchu mezi jednotlivými měřeními. První měření (—), patnácté měření (—).

Dále bylo zjištěno, že největší míry opakovatelnosti měření je dosaženo, je-li GCE leštěna na alumině alespoň po dobu 30 s. S touto úpravou elektrody mezi měřeními bylo provedeno deset měření roztoků IAA a IBA o koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  v prostředí  $0,05\text{M}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ , získaná data byla statisticky zpracována (tab. 4.1). Je patrné, že takto naměřená hodnoty se dají považovat za spolehlivé, jelikož relativní směrodatná odchylka pro obě stanovované látky je menší než 5%.

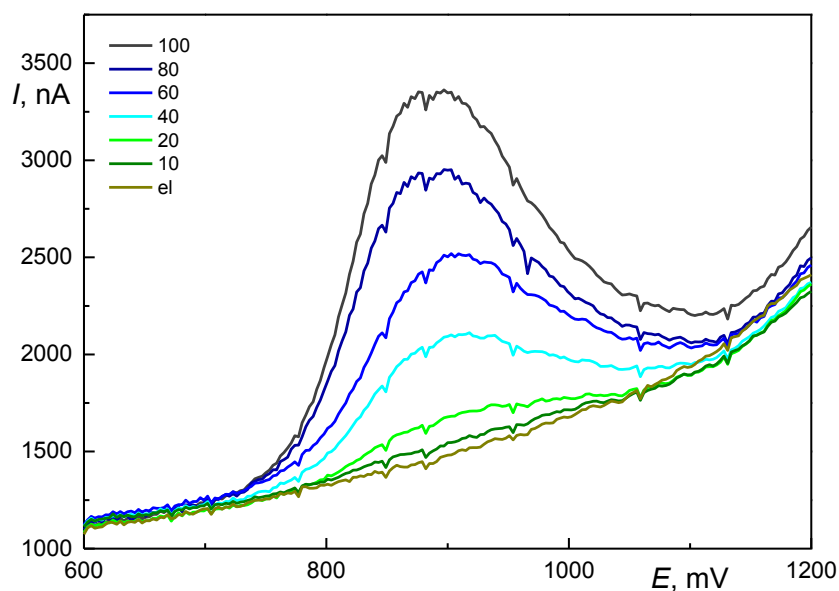
**Tab. 4.1** Vyhodnocení opakovatelnosti měření po leštění GCE po dobu 30 s

analyt	výška píku $\pm L_{1,2}$ [nA]	RSD [%]
IAA	$1708,8 \pm 45,4$	3,7
IBA	$1278,2 \pm 23,9$	2,6

### 3.3 Kalibrační křivky

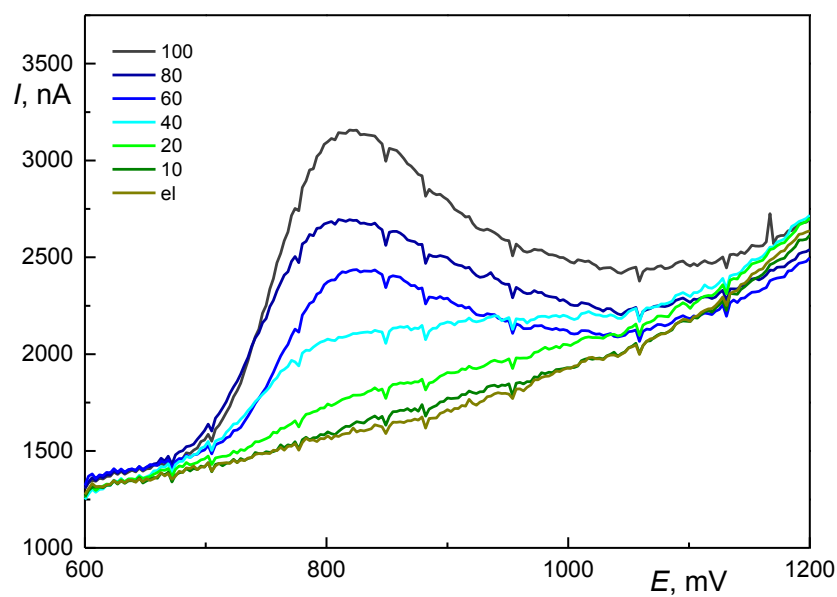
Po zjištění optimálních podmínek měření bylo třeba ověřit linearitu proudové odezvy v závislosti na koncentraci studovaných látek. Pro každou z látek byly proměřeny kalibrační roztoky o koncentraci 10, 20, 40, 60, 80 a 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  v prostředí 0,05M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Nižší koncentrace ani jedné z látek již neposkytovaly signál rozeznatelný od šumu.

Vybrané voltamogramy provedených měření jsou znázorněny na obr. 4.8 pro IAA a obr. 4.9 pro IBA. Kalibrační závislost z výšek píků každé z látek je dále vidět na obr. 4.10 a obr. 4.11.

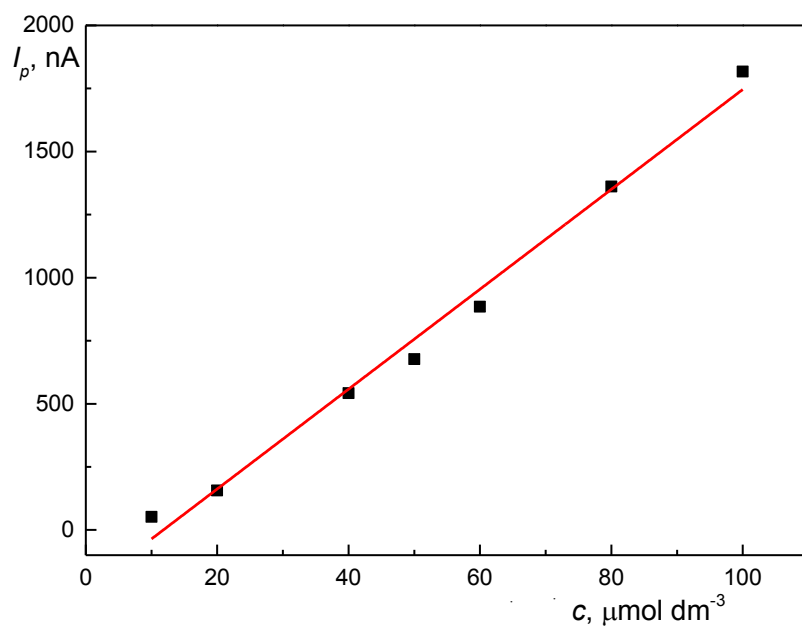


**Obr. 4.8** Voltamogramy IAA v rozmezí koncentrací 10, 20, 40, 60, 80 a 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Základní elektrolyt 0,05M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o pH 1,2, měřeno na GCE metodou DPV.

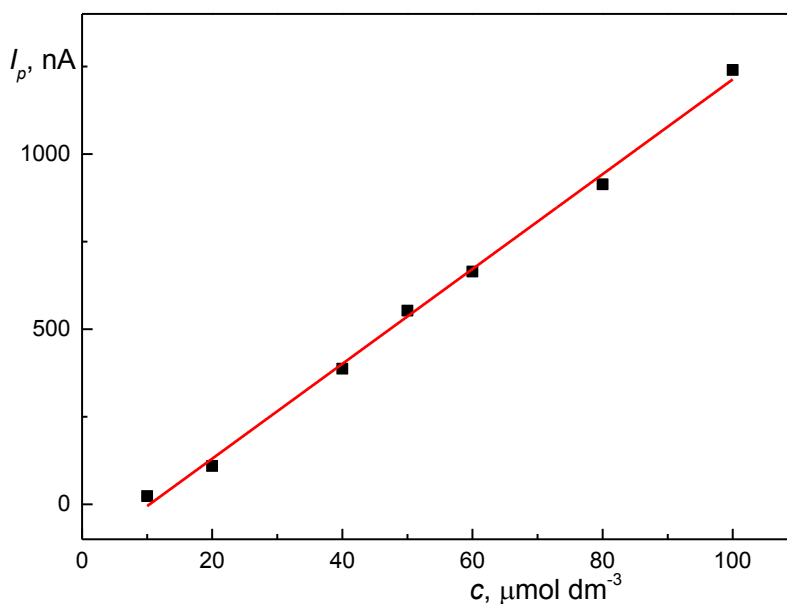




**Obr. 4.9** Voltamogramy IBA v rozmezí koncentrací 10, 20, 40, 60, 80 a 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .  
Základní elektrolyt 0,05M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o pH 1,2, měřeno na GCE metodou DPV.



**Obr. 4.10** Kalibrační závislost IBA pro koncentrační rozmezí 10 až 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .  
Základní elektrolyt 0,05M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o pH 1,2, měřeno na GCE metodou DPV.



**Obr. 4.11** Kalibrační závislost IBA pro koncentrační rozmezí 10 až 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Základní elektrolyt 0,05M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o pH 1,2, měřeno na GCE metodou DPV.

Důležitými údaji o citlivosti metody jsou meze detekce (*LOD*) a stanovitelnosti (*LOQ*). Pro jejich určení bylo provedeno deset opakovaných měření nejnižší měřené koncentrace obou látek, tedy 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Tyto vypočítané meze a další parametry kalibračních závislostí IAA a IBA jsou uvedeny v tab. 4.2. Hodnoty korelačních koeficientů potvrzují linearitu proudové odezvy v závislosti na koncentraci u obou stanovovaných látek. Zjištěné meze detekce a stanovitelnosti odpovídají hodnotám uváděným v literatuře, jsou-li použity elektrody bez dalších speciálních úprav pro zvýšení citlivosti.

**Tab. 4.2** Parametry kalibračních závislostí IAA a IBA

analyt	směrnice [nA]	úsek [nA· $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3$ ]	<i>R</i>	<i>LOD</i> [ $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]	<i>LOQ</i> [ $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]
IAA	19,8 ± 0,9	-233,7 ± 52,8	0,9940	1,3	4,2
IBA	13,5 ± 0,3	-140,6 ± 19,6	0,9982	1,6	5,2

### 3.4 Voltametrické stanovení IAA a IBA vedle sebe s využitím dekonvoluce

Pro společné stanovení obou látek bylo připraveno pět roztoků s různými poměry koncentrací IAA a IBA, jako základní elektrolyt byl použit 0,05M roztok  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o pH 1,2. Všechny roztoky byly proměřeny metodou diferenční pulsní voltametrie s použitím elektrody ze skelného uhlíku. Následně byla v programu Origin 2016 provedena dekonvoluce naměřených křivek.

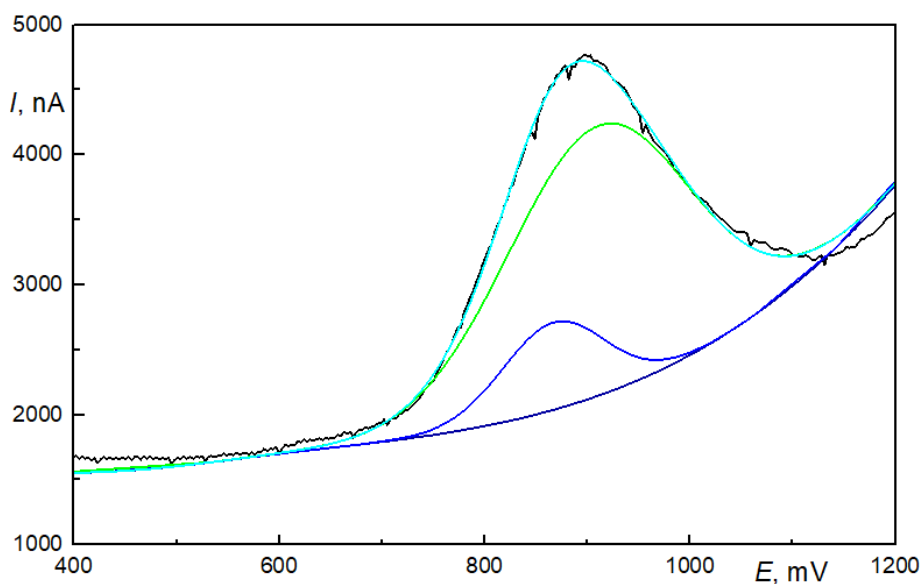
Výšky píků IAA a IBA získaných dekonvolucí byly přepočítány na koncentraci, které by dle kalibrační závislosti měly odpovídat. Srovnání těchto vypočtených koncentrací se skutečnými je vidět v tab. 4.3.

**Tab. 4.3** Srovnání skutečných a vypočítaných koncentrací IAA a IBA v připravených roztocích

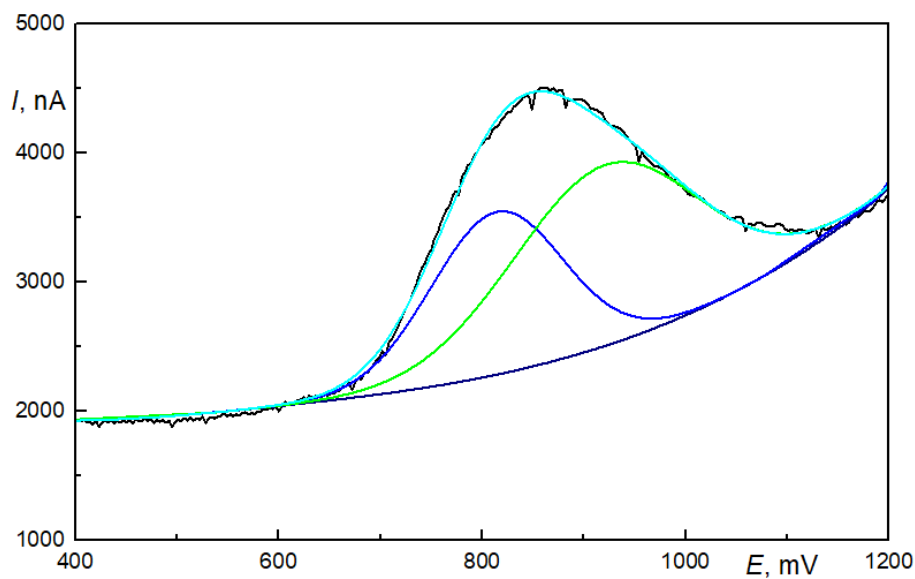
číslo roztoku	analyt	skutečná c	vypočtená c
		$[\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$[\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}]$
1	IAA	100	140,2
	IBA	100	71,2
2	IAA	100	116,7
	IBA	50	60,2
3	IAA	100	–
	IBA	10	–
4	IAA	50	82,6
	IBA	100	103,8
5	IAA	10	–
	IBA	100	–

Nejlepšího, avšak přesto velmi nepřesného výsledku bylo dosaženo dekonvolucí křivky naměřené v roztoku číslo 2 (obr. 4.12) s koncentracemi  $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  IAA a  $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  IBA, přibližného výsledku potom také v roztoku číslo 4 s opačnými koncentracemi obou analytů. Zajímavé je, že jen křivka naměřená v roztoku s tímto poměrem koncentrací viditelně nabývá tvaru dvojpíku (obr. 4.13). Výsledky získané

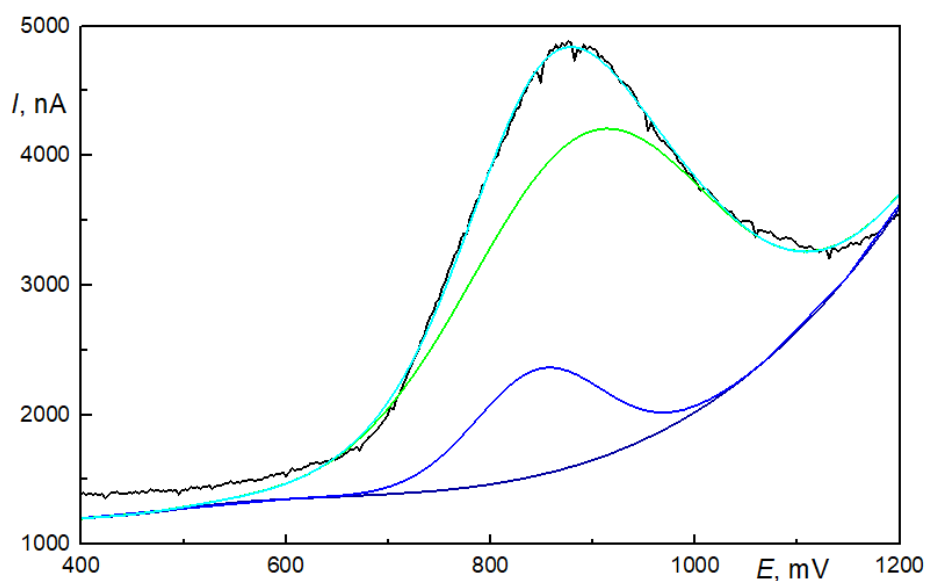
z roztoku číslo 1 se stejnými koncentracemi IAA a IBA se od skutečnosti lišily značně (obr. 4.14). Dekonvoluce křivek získaných z roztoků 3 a 5, ve kterých byl poměr koncentrací obou analytů 1:10, neměla vypovídající hodnotu, což se ovšem dalo předpokládat, vzhledem k malé proudové odpovědi, kterou koncentrace  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  obou látek poskytovala již při kalibraci.



**Obr. 4. 12** Dekonvoluce křivky získané z roztoku číslo 2 s koncentrací  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  IAA a  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  IBA v prostředí  $0,05\text{M H}_2\text{SO}_4$ . Měřeno na GCE metodou DPV. Původní křivka (—), křivka získaná Gaussovou aproximací (—), pík IBA (—), pík IAA (—).



**Obr. 4.13** Dekonvoluce křivky získané z roztoku číslo 4 s koncentrací  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  IAA a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  IBA v prostředí  $0,05\text{M H}_2\text{SO}_4$ . Měřeno na GCE metodou DPV. Původní křivka (—), křivka získaná Gaussovou aproximací (—), pík IBA (—), pík IAA (—).



**Obr. 4.14** Dekonvoluce křivky získané z roztoku číslo 1 s koncentrací  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  IAA a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  IBA v prostředí  $0,05\text{M H}_2\text{SO}_4$ . Měřeno na GCE metodou DPV. Původní křivka (—), křivka získaná Gaussovou aproximací (—), pík IBA (—), pík IAA (—).

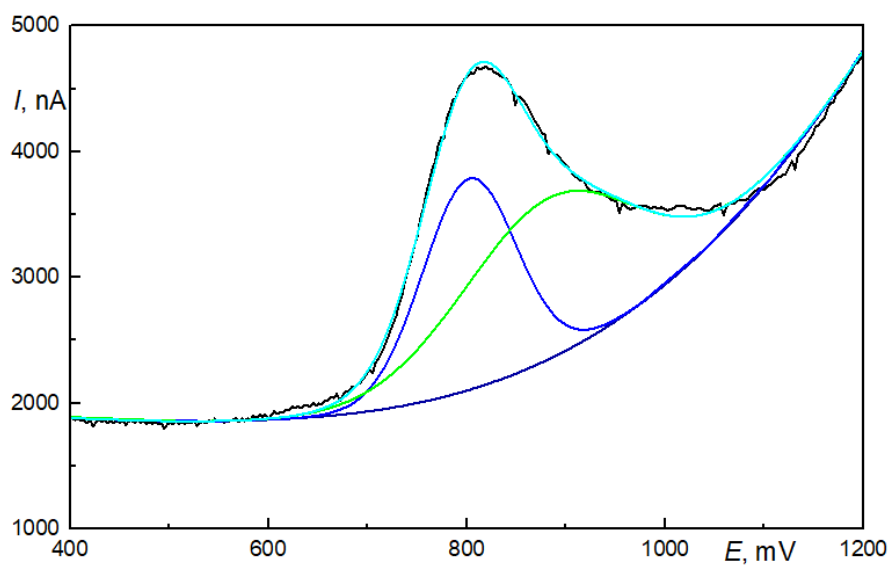
### 3.5 Voltametrické stanovení IAA a IBA v přípravku Stimulax

Stimulax je komerčně prodáváný přípravek napomáhající zakořeňování řízků rostlin. Deklarovaný obsah IAA je 0,06% a IBA 0,05%. Podle těchto údajů by tedy v přípravku měla být koncentrace IAA asi  $3,4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a IBA asi  $2,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Ze srovnávacího měření metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) však víme, že skutečná koncentrace analytů je asi  $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  IAA a  $2,2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  IBA.

Pro měření byl použit 1 ml přípravku doplněný 9 ml 0,05M roztoku  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Píky IAA a IBA získané dekonvolucí jsou vidět na obr. 4.13. Výšky těchto píků byly přepočítány na koncentrace jednotlivých analytů, kterým by dle kalibračních závislostí měly odpovídat. Porovnání deklarovaných koncentrací, koncentrací naměřených metodou HPLC-ED a koncentrací zjištěných dekonvolucí naměřeného voltamogramu jsou uvedeny v tab. 4.5. Z hodnot v tabulce je zjevné, že výrobcem deklarované koncentrace neodpovídají realitě a že výsledky získané dekonvolucí jsou jen přibližné.

**Tab. 4.5.** Porovnání koncentrace IAA a IBA v přípravku Stimulax

analyt	$c$ deklarovaná [mmol·dm <sup>-3</sup> ]	$c$ zjištěná metodou HPLC-ED [mmol·dm <sup>-3</sup> ]	$c$ zjištěná dekonvolucí [mmol·dm <sup>-3</sup> ]
IAA	3,4	0,6	0,8
IBA	2,5	2,2	1,4



**Obr. 4.13** Dekonvoluce křivky získané z roztoku přípravku Stimulax v prostředí 0,05M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Měřeno na GCE metodou DPV. Původní křivka (—), křivka získaná Gaussovou aproximací (—), pík IBA (—), pík IAA (—).

## 4. Závěr

V této práci bylo studováno voltametrické chování kyseliny indolmásečné a indolactové metodou diferenční pulsní voltametrie s použitím uhlíkové pastové elektrody a elektrody ze skelného uhlíku. Bylo zjištěno, že uhlíková pastová elektroda je pro stanovování těchto látek nevhodná. Na naměřených voltamogramech se před píky studovaných látek objevovaly další menší píky, způsobené pravděpodobně jejich oxidačními produkty, k jejichž odstranění nenapomohlo ani obnovování povrchu elektrody po každém měření. Při zkoumání pasivace elektrody ze skelného uhlíku byl vznik těchto píků pozorován také, bylo mu nicméně možné předcházet leštěním elektrody na alumině alespoň po dobu 30 s před každým měřením.

Vzhledem k záměru stanovovat studované látky vedle sebe bylo třeba najít takové pH základního elektrolytu, při kterém obě poskytují co možná nejvyšší proudovou odezvu, mají dobře definovaný tvar píku a současně je mezi jejich píky co největší rozdíl potenciálů. Tyto podmínky byly splněny při použití 0,05M roztoku kyseliny sírové o pH 1,2.

Kalibrační závislost obou látek byla měřena v koncentračním rozmezí 10 – 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , zjištěné meze detekce byly 1,3  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  pro IAA a 1,6  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  pro IBA.

S využitím dekonvoluce se podařilo v připravených roztocích stanovit obě látky vedle sebe. Výsledky však byly značně nepřesné a spíše orientační. Hodnot nejvíce se blížících skutečnosti bylo dosaženo v těch roztocích, kde byl poměr koncentrací látek 1:2. Nakonec byl proměřen reálný vzorek – přípravek Stimulax, používaný ke zlepšení zakořeňování řízků. Dekonvolucí získané výsledky však byly oproti srovnávacímu měření metodou HPLC-ED jen velmi nepřesné.



## 5. Literatura

1. Wu, K.; Sun, Y.; Hu, S.: Development of an amperometric indole-3-acetic acid sensor based on carbon nanotubes film coated glassy carbon electrode. *Sensors Actuators B* **96**, 658–662 (2003).
2. de Toledo, R. A.; Vaz, C. M. P.: Use of a graphite-polyurethane composite electrode for electroanalytical determination of indole-3-acetic acid in soil samples. *Microchem. J.* **86**, 161–165 (2007).
3. Guo, J. M.; Xin, Y. Y.; Yin, X. B.: Selective differentiation of indoleacetic acid and indolebutyric acid using colorimetric recognition after ehrlich reaction. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 6556–6561 (2010).
4. Gangolli, S.: *The Dictionary of Substances and Their Effects 3*, London, Royal Society of Chemistry 1999, p.758.
5. Milne, G. W. A.: *Gardner's Commercially Important Chemicals: Synonyms, Trade Names, and Properties*, Hoboken, Wiley 2005, p. 337.
6. Calatayud, J. M.; De Ascensão, J. G.; Albert-García, J. R.: FIA-fluorimetric determination of the pesticide 3-indolyl acetic acid. *J. Fluoresc.* **16**, 61–67 (2006).
7. Paranjape, K.; Gowariker, V.; Krishnamurthy, V N; Gowariker, S.: *The Pesticide Encyclopedia*, Wallingford, CABI 2014, p. 262.
8. Yang, Y. J.; Xiong, X., Hou, K.; Hu, S.: The amperometric determination of indole-3-acetic acid based on CeCl<sub>3</sub>-DHP film modified gold electrode. *Russ. J. Electrochem.* **47**, 47–52 (2011).
9. Woodward, A. W.; Bartel, B.: Auxin: Regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* **95**, 707–735 (2005).
10. Olsson, J. C.; Andersson, P. E.; Karlberg, B.; Nordström, A. C.: Determination of plant indoles by capillary electrophoresis with amperometric detection. *J. Chromatogr. A* **755**, 289–298 (1996).

11. Enders, T. A.; Strader, L. C.: Auxin Activity: Past, present, and Future. *Am. J. Bot.* **102**, 180–196 (2016).
12. Official Journal of the European Union; *COMMISSION REGULATION (EU) 2016/71*; dostupné z URL: [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L\\_.2016.020.01.0001.01.ENG](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L_.2016.020.01.0001.01.ENG) [cit. 24.3. 2018]
13. Bodur, E.; Cokugras, A. N.: The effects of indole-3-acetic acid on human and horse serum butyrylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact.* **157–158**, 375–378 (2005).
14. Na, J.-I. *et al.*: Indole-3-acetic acid: A potential new photosensitizer for photodynamic therapy of acne vulgaris. *Lasers Surg. Med.* **43**, 200–205 (2011).
15. Sigma-Aldrich, *Bezpečnostní list: Indole-3-butyric acid*, dostupné z URL: <https://www.sigmaaldrich.com> [cit. 1.4.2018]
16. Simon, S.; Petrášek, J.: Why plants need more than one type of auxin. *Plant Sci.* **180**, 454–460 (2011).
17. Štefančíč, M.; Štampar, F.; Osterc, G.: Influence of IAA and IBA on root development and quality of Prunus „GiSelA 5" leafy cuttings. *HortScience* **40**, 2052–2055 (2005).
18. Sauer, M.; Robert, S.; Kleine-Vehn, J.: Auxin: Simply complicated. *J. Exp. Bot.* **64**, 2565–2577 (2013).
19. Lodama, K. E. *et al.*: Improving rooting of Lobostemon fruticosus L. cuttings with delayed auxin treatment. *South African J. Bot.* **105**, 111–115 (2016).
20. Nakhooda, M.; Rambaran, N.; Mokotedi, M. E. O.; Watt, M. P.: Sensitivity and response of Eucalyptus grandis × E. Nitens cuttings to auxin treatment for rooting is consistent with, and can be predicted by in vitro morphogenesis. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **89**, 215–220 (2014).

21. Benmahiou, B.; Dorion, N.; Kaid-Harche, M.; Daguin, F.: Micropropagation and ex vitro rooting of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **108**, 353–358 (2012).
22. Ma, Z. *et al.*: Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Anal. Chim. Acta* **610**, 274–281 (2008).
23. Lu, Q.; Zhang, L.; Chen, T.; Lu, M.; Ping, T.; Chen, G.: Identification and quantitation of auxins in plants by liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 2565–2572 (2008).
24. Han, Z. *et al.*: A liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of acid/alkaline phytohormones in grapes. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **881–882**, 83–89 (2012).
25. Xi, Z.; Zhang, Z.; Sun, Y.; Shi, Z.; Tian, W.: Determination of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid in mung bean sprouts using high performance liquid chromatography with immobilized  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -  $\text{KMnO}_4$  chemiluminescence detection. *Talanta* **79**, 216–221 (2009).
26. Sheikhan, L.; Bina, S.: Simultaneous extraction and HPLC determination of 3-indole butyric acid and 3-indole acetic acid in pea plant by using ionic liquid-modified silica as sorbent. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1009–1010**, 34–43 (2016).
27. Porfírio, S. *et al.*: Quantification of free auxins in semi-hardwood plant cuttings and microshoots by dispersive liquid–liquid microextraction/microwave derivatization and GC/MS analysis. *Anal. Methods* **8**, 6089–6098 (2016).
28. Yardim, Y.; Şentürk, Z.: Voltammetric behavior of indole-3-acetic acid and kinetin at pencil-lead graphite electrode and their simultaneous determination in the presence of anionic surfactant. *Turkish J. Chem.* **35**, 413–426 (2011).

29. Yardim, Y.; Erez, M. E.: Electrochemical Behavior and Electroanalytical Determination of Indole-3-Acetic Acid Phytohormone on a Boron-Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis* **23**, 667–673 (2011).
30. Shen, Y.; Li, X.; Chen, W.; Cheng, F.; Song, F.: Electrochemical determination of indole butyric acid by differential pulse voltammetry on hanging mercury drops electrode. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **22**, 319–323 (2013).
31. Raspor, B.; Pižeta, I.; Branica, M.: Comparative quantitative analysis of overlapping voltammetric signals. *Anal. Chim. Acta* **285**, 103–111 (1994).
32. Esteban, M.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.: Chemometrics for the analysis of voltammetric data. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **25**, 86–92 (2006).